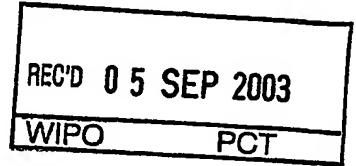


PCT/EP 03 / 06509



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 27 611.0

**Anmeldetag:** 20. Juni 2002

**Anmelder/Inhaber:** Bionethos Holding GmbH, Lehrte/DE

**Bezeichnung:** Verfahren und Vorrichtung zur Vermehrung und Differenzierung von Zellen in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren und einer biologischen Matrix oder Trägersubstanz

**IPC:** C 12 N, C 12.M

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 27. Juni 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Jerofsky

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

A 9161  
02/00  
EDV-L

**BEST AVAILABLE COPY**

20.6.2002  
B38209

Bionethos Holding GmbH

**Verfahren und Vorrichtung zur Vermehrung und Differenzierung von Zellen  
in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren und einer biologischen Matrix oder  
Trägerstruktur**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem Wachstumsfaktor in isolierter Form zur Kultivierung von primär differenzierten Zellen, zur lokal spezifischen und/oder gerichteten Differenzierung adulter Zellen und/oder zur Regeneration von Knochen, Geweben und/oder endokriner Organe.

10

In der Ontogenese, also der Keimesentwicklung des Einzelwesens, werden Wachstumsfaktoren exprimiert, die grundlegende strukturelle und hinsichtlich der Zellzahl numerische Prozesse auslösen können. Im wachsenden Organismus geht die Fähigkeit zu strukturellen Reparaturen durch Regeneration zunehmend verloren, da diese Wachstumsfaktoren nicht mehr exprimiert werden. Faktoren des 15 Knochenmarks bzw. der blutbildenden Organe sind während spezifischen ontogenetischen Prozessen an Wachstumsprozesse anderer Organe zeitlich gekoppelt.

20

Ein Nachteil bekannter Wachstumsfaktoren, wie z.B. "Epidermal Growth Factor" (EGF), "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF) oder "Hepatocyte Growth Factor" (HGF), ist dass die Vermehrungsprozesse, insbesondere beim Einsatz primärer Zellen in vitro limitiert sind und dass der Einsatz in vivo wegen möglicher Nebenwirkungen, wie z.B. der Aktivierung von Onkogenen, problematisch ist.

25

Bisher wurde angenommen, dass Gewebeextrakte, wie z.B. aus der Hypophyse oder dem Hypothalamus, besonders geeignet sind, eine Zellvermehrung bei Hepatozyten zu bewirken (siehe z.B. U.S. 6,008,047). Derartige tierische oder gelegentlich humane Extrakte wurden bereits Zellkulturen zugegeben. Die Verwen-

dung tierischer oder humaner Gewebeextrakte ist vor dem Hintergrund übertragbarer viraler Erkrankungen, wie z.B. BSE, Schweine- oder Schaf-Viren, im Laborbetrieb oder in der klinischen Anwendung jedoch problematisch. Die Verwendung derartiger Extrakte dokumentiert das mangelnde Wissen der eigentlich relevanten Faktoren und deren Einsatz- und Wirkpotentiale. Ein weiterer wesentlicher Nachteil ist, dass durch derartige heterogene Extrakte, die im allgemeinen schwer definierbar sind und erheblich von der verwendeten Quelle abhängen, auch Faktoren in die Kultur eingebracht werden, die unter Umständen bei einer klinischen Anwendung unerwünschte Nebenwirkungen oder Eigenschaften bewirken. Die genaue Kenntnis der Faktoren und deren kontrollierten Gabe wäre daher sowohl ein wichtiger Faktor, um Zellen, insbesondere im Bereich des Tissue Engineering, entsprechend vermehren und differenzieren zu können als auch um strukturelle Prozesse der dreidimensionalen (3-D) Regeneration zu induzieren.

Insbesondere beim Tissue Engineering stehen derartige strukturelle Vorgaben im Vordergrund, wobei das 3-D-Wachstum und dessen Initiation bisher nicht verstanden ist. Konventionelle Ansätze wie Aggregatkulturen erreichen zwar eine hohe Dichte, müssen aber mit vorexpandierten oder aus primären Geweben isolierten Zellen, z. B. Hepatozyten, aufgebaut werden. Ein induktiver Wachstumsprozess in eine bestimmte, vorgegebene Struktur war bisher nicht möglich.

Im Gegenteil werden heutzutage noch Zellen, wie z.B. Hepatozyten, nach den Vermehrungsphasen in ein Gel eingebettet, um die Bildung von weiteren, auch großen Aggregaten (Superaggregaten) zu vermeiden. Diese Gele sind in der Ausdehnung zweidimensional, enthalten eine hohe Zelldichte und stoppen daher die Zellvermehrung. Derartige 2-D-Geleinschlüsse, die in Schichten resultieren, wurden bereits von Bader et al. (1995), Artif. Organs., 19, 368-374 als Sandwichmodell oder "gel entrapment" beschrieben. Durch die Einbettung von Aggregaten in Gelen kommt es zwar zu einer Verbesserung des Erhalts der Differenzierung, jedoch nicht zu einem weiteren Wachstum.

Ein formschaffendes Wachstum aus wenigen Vorläuferzellen in eine 3-D-Struktur und ein induktives Verhalten für Nachbarschaftsprozesse im Sinne einer Gewebe-regeneration in vitro und in vivo war bisher nicht möglich. Ein induktive Wachstumsverhalten von Zellen bedeutet jedoch gerade für therapeutische oder biotechnologische Prozesse eine erhebliche Innovation. Ein derartiges Wachstumsverhalten sollte, unterstützt durch eine 3D Trägermatrix, ein Wachstum nicht nur im Sinne einer Besiedlung oder einem strukturellen Remodelling erlauben, sondern tatsächlich eine gerichtete de novo Formierung aus einem Induktionsnukleus erlauben können. Derartige Prozesse laufen in der Ontogenese ab und bauen auf eine vorher existierende Anlage auf.

Bekannt ist lediglich, dass Wachstumsfaktoren, insbesondere bei neuronalen Progenitoren fötalen Ursprungs wie z.B. "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF), "Ciliary Neurotropic Factor" (CNTF), "Glial Derived Neurotrophic Factor" (GDNF) oder "nerve growth factor" (NGF), eine Proliferationsphase undifferenzierter Neuronen ermöglichen. Nach Erreichen einer Differenzierung können diese Faktoren jedoch nicht mehr wirken.

Beim Tissue Engineering haben wir zusätzlich das Problem, dass patientenspezifische, adulte Zellsysteme verwendet werden, die bereits weiter differenziert sind als fötale Zellen. Zusätzlich handelt es sich in situ als auch in vitro um Kokultursituationen, die in der klassischen Anwendung nicht berücksichtigt werden. Im Gegenteil es wird beispielsweise sogar versucht, Kokulturen aus Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten, wie sie in der Leber vorkommen, bei der Expansion der parenchymatösen Leberzellen zu vermeiden, da sie nicht erwünscht sind. Man weiß jedoch inzwischen, dass die Gegenwart dieser sogenannten nichtparenchymalen Zellen in differenzierten Kulturen wesentlich zu der Differenzierung beitragen.

Es ist daher wünschenswert, ein Vermehrungsverfahren in vitro und/oder ein Regenerationsverfahren in vivo zu schaffen, das den physiologischen Zustand dieser

Zellsysteme im wesentlichen erhalten kann und ein im wesentlichen strukturelles Wachstum ermöglicht.

Es wurde nun gefunden, dass die Verwendung der Wachstumsfaktoren Thrombo-  
5 poietin (TPO) und/oder Erythropoietin (EPO) und/oder Wachstumshormon (GH), und/oder Somatostatin und/oder "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF) und/oder "Ciliary Neurotropic Factor" (CNTF) die Vermehrung und Differenzierung von Zellen einleitet bzw. terminiert und strukturell lenkt.

10 Überraschenderweise wurde hierdurch nicht nur eine Vermehrung der Zellen, sondern auch eine Induzierung struktureller Prozesse bewirkt, insbesondere wenn über eine induktive Wirkung bei einem Implantat vor Ort (in situ) beispielsweise über einen sogenannten Homingprozess eine lokal spezifische Zellvermehrung und gerichtete Differenzierung bewirkt wird. Das bedeutet, dass die Wachstums-  
15 hormone diese strukturellen Prozesse auslösen aber auch terminieren können.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Vermehrung und Differenzierung von Zellen in vitro, bei dem der Wachstumsprozess der Zellen durch den Einsatz der Wachstumsfaktoren TPO und/oder EPO und/oder GH, insbesondere  
20 HGH und/oder Somatostatin und/oder LIF und/oder CNTF eingeleitet bzw. terminiert und strukturell gelenkt wird.

So ist TPO beispielsweise auch bekannt als c-Mpl-Ligand, mpl-Ligand, Megapoietin oder Megakariozyten-Wachstums- und Entwicklungsfaktor und wurde bislang nicht in der Kultur von z. B. adulten Hepatozyten oder anderen primären Zellen eingesetzt, außer von Thrombozyten oder ihren Vorläufern. TPO ist essentiell notwendig für die Entwicklung und Proliferation von Megakariozyten und Thrombozyten und somit für die Bildung von Blutplättchen. TPO wird als 332 Aminosäure-langes Protein konstitutiv in der Leber und in den Nieren produziert.

Als zusätzliche Wachstumsfaktoren können gemäß der vorliegenden Erfindung "Transforming Growth Factor beta" (TGF beta), Prostaglandine, Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor (GM-CSF), "Growth Hormone Releasing Hormone" (GHRH), "Thyrotropin-releasing Homone" (TRH), "Gonadotropin-releasing Hormone" (GnRH), "Corticotropin-releasing Hormone" (CRH), Dopamin, "Antidiuretic Hormon" (ADH), Oxytocin, Prolactin, Adrenocorticotropin, beta-Celltropin, Lutrotropin und/oder Vasopressin eingesetzt werden.

Neben einer Beendigung bzw. Reduzierung der Zufuhr der beschriebenen Wachstumsfaktoren zu der Kultur eignen sich zur Terminierung des erfindungsgemäßen Wachstumsprozesses auch Somatostatin und/oder TGF beta und/oder Prostaglandine.

Die einzelnen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren liegen in Lösung üblicherweise bei ca. 1 bis ca. 100 ng/ml, vorzugsweise bei ca. 10 bis ca. 50 ng/ml, insbesondere bei ca. 10 bis ca. 20 ng/ml. Bei lokalen Beschichtungen können die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren jedoch auch ein Vielfaches davon betragen.

Beispielsweise können bei der Regeneration endokriner Organe die Interaktion der Wachstumsfaktoren, insbesondere von "Growth Hormone Releasing Hormone" (GHRH), "Thyrotropin-releasing Homone" (TRH), "Gonadotropin-releasing Hormone" (GnRH), "Corticotropin-releasing Hormone" (CRH), Somatostatin, Dopamine, "Antidiuretic Hormone" (ADH) und/oder Oxytocin, mit der Trägermatrix in situ eine endokrine Differenzierung und/oder Wachstum auslösen.

Des weiteren können Prolactin, Adrenocorticotropin, beta-Celltropin, Lutrotropin und/oder Vasopressin für die strukturellen Prozesse eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform können zusätzlich ein oder mehrere Nervenregenerationsfaktoren, vorzugsweise "nerve growth factor" (NGF) und/oder ein oder

mehrere Gefäßregenerationsfaktoren, vorzugsweise "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF) und/oder "Plateled Derived Growth Factor" (PDGF), eingesetzt werden.

5 In Anwesenheit von Endothelzellen kann auch eine Endothelialisierung der Zellen und somit eine optimale Hämokompatibilität erreicht werden.

Die genannten Wachstumsfaktoren sind im allgemeinen käuflich zu erwerben, können aber auch gentechnisch nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt werden. Sie umfassen nicht nur die natürlich vorkommenden Wachstumsfaktoren, sondern auch Derivate oder Varianten mit im wesentlichen derselben biologischen Aktivität.

15 So ist beispielsweise TPO von der Fa. CellSystems GmbH, St. Katharinen käuflich zu erwerben. Für die Kultivierung von humanen adulten Hepatozyten wird die Verwendung von humanem TPO bevorzugt. Des weiteren ist die Herstellung und Charakterisierung von TPO und dessen Varianten beispielsweise in EP 1 201 246, WO95/21919, WO95/21920 und WO95/26746 beschrieben.

20 Als Varianten von TPO eignen sich beispielsweise die in der WO95/21919 beschriebenen TPO-Derivate oder die in WO95/21920 beschriebenen allelischen Varianten oder Spezieshomologe oder das in WO95/26746 und EP 1 201 246 beschriebene pegyierte TPO, ohne sie darauf zu beschränken. Als pegyierte TPO wird im Sinne der vorliegenden Erfindung TPO-Derivate verstanden, die an ein 25 organisches Polymer, wie z.B. Polyethylenglykol, Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylen, gebunden sind. Als weitere Varianten von TPO werden auch Derivate von TPO verstanden, die eine Sequenzidentität von weniger als 100% besitzen und dennoch die Aktivität von TPO, wie vorzugsweise in EP 1 201 246 beschrieben, besitzen. Üblicherweise besitzen TPO-Derivate eine Sequenzidentität 30 von mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, insbesondere mindestens 80% und vor allem mindestens 85% im Vergleich zu humanem TPO einschließ-

lich derer Fragmente mit TPO-Aktivität. Eine besonders bevorzugte TPO-Aktivität im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Beschleunigung der Proliferation, Differenzierung und/oder Reifung von Megakaryozyten oder Megakaryozyten-Vorläufer in Plättchen-produzierende Formen dieser Zellen durch TPO oder dessen Varianten.

EPO wird auch als embryonale Form des TPO bezeichnet und ist mit seinen Varianten z. B. in der EP 0 148 605, EP 0 205 564, EP 0 209 539, EP 0 267 678 oder EP 0 411 678 beschrieben.

10

Die oben näher beschriebenen, beispielhaften Derivate und Varianten gelten in analoger Weise auch für die anderen genannten Wachstumsfaktoren.

15

Der Begriff Wachstumsfaktor ist folglich gemäß der vorliegenden Erfindung nicht nur auf die natürlich vorkommenden Formen beschränkt, sondern umfasst auch nicht natürlich vorkommende Formen bzw. Varianten oder Derivate. Der Begriff Wachstumsfaktor umfasst gemäß der vorliegenden Erfindung nicht nur Wachstumsförderer, sondern auch Wachstumsinhibitoren, wie z. B. Somatostatin, TGF beta und/oder Prostaglandine. Derartige Wachstumsinhibitoren eignen sich insbesondere zur Unterdrückung bzw. Hemmung des Wachstums von veränderten Zellen, wie z. B. Tumorzellen, indem diese gleichzeitig oder sequenziell beispielsweise auch mittels Hydrogele oder Slow-release Materialien hochkonzentriert, lokal eingesetzt werden.

20

25

Der erfindungsgemäße Wachstumsprozess wird in einer für die jeweiligen Zellen geeigneten Kultur durchgeführt. Hierbei können mittels einer geeigneten Vorrichtung die sich gegebenenfalls während des Wachstumsprozesses bildenden Zellaggregate zerkleinert und gegebenenfalls eingekapselt und gegebenenfalls eingefroren werden.

30

Als Vorrichtung eignet sich beispielsweise ein Gitter mit z. B. einer schneidenden Maschenstruktur von beispielsweise 500 µm Größe, die bewirkt, dass immer wieder neue Tochteraggregate von beispielsweise Hepatozyten entstehen können. Dies kann vorteilhafterweise in einem vollständig geschlossenen System geschehen. Insbesondere können berührungslose, automatisch oder manuell gesteuerte Pumpensysteme eingesetzt werden, die z. B. aus Kolbenpumpen bestehen oder magnetisch bzw. durch Druckluftkompression von Schläuchen erzeugte, gerichtete Ströme erzeugen. In Anwesenheit von Endothelzellen kann es durch den Scherstress in einem perfundierten Bioreaktor zu einer spontanen Konfluenz der Endothelzellen auf den Oberflächen der Aggregate kommen, was für die weitere Verwendung vorteilhaft sein kann.

Für die Einkapselung eignen sich dem Fachmann bekannte, geeignete Materialien, in die beispielsweise strukturierte Formen oder Räume integriert werden, die eine in situ Wachstumsstruktur bzw. Vergrößerung ermöglichen. Alternativ kann auf die Kapsel verzichtet werden und beispielsweise in Gegenwart von Endothelzellen eine Endothelialisierung und somit eine optimale Hämokompatibilität erreicht werden.

In einer weiteren Ausführungsform wird der Wachstumsprozess der Zellen lokal eingeleitet bzw. terminiert und strukturell gelenkt, vorzugsweise durch eine biologische Matrix.

Die biologische Matrix wird hierbei beispielsweise mit einem der genannten Wachstumsfaktoren oder mit einer Kombination der genannten Wachstumsfaktoren als Mischung oder sequenziell behandelt. Hierdurch wird auch bei adulten Zellsystemen noch eine 3D-Regeneration und/oder eine artifizielle Lenkung einer Gewebereparatur bzw. Gewebezüchtung ermöglicht.

Die biologische Matrix ist üblicherweise ein Implantat, z. B. ein Stent, ein Patch oder ein Katheter, ein Transplantat, z. B. ein Hauttransplantat, und/oder ein Trä-

germaterial zum Wachstum von Zellen, z.B. ein sogenanntes Slow-release Material, z.B. ein Hydrogel beispielsweise auf der Basis von Fibrin und/oder Polymere, wie z. B. Polylaktid oder Polyhydroxyalkanoat, und/oder Alginate, ein Knochenersatzmaterial, z.B. Tricalciumphosphat, ein allogenes, autologes oder xenogenes  
5 azellularisiertes oder nicht-azellularisiertes Gewebe, z.B. eine Herzklappe, Venenklappe, Arterienklappe, Haut, Gefäß, Aorta, Sehne, Comea, Knorpel, Knochen, Tracea, Nerv, Miniskus, Diskus intervertebralis, Ureteren, Urethra oder Blase (siehe z. B. EP 0 989 867 oder EP 1 172 120), eine Matrix wie z.B. eine Laminin-, Collagen IV- und/oder Matrigel-Matrix, vorzugsweise ein Feeder-Layer, wie  
10 z.B. Collagen I-, 3T3- und/oder MRC-5-Feeder Layer, oder ein Collagenfließ.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die biologische Matrix mit Zellen, vorzugsweise gewebespezifischen Zellen, Vorläuferzellen, Knochenmarkszellen, peripheres Blut, Fettgewebe und/oder Fasergewebe, z.B. mit adulten  
15 Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach dem Fachmann bekannten Verfahren vorbesiedelt. Dadurch kann erreicht werden, dass der *in vivo* Wundheilungsprozess *in vitro* vorweggenommen wird und damit nach Implantation *in vivo* eine verkürzte Reintegrationszeit erfolgt.

20 Als Zellen gemäß der vorliegenden Erfindung werden insbesondere adulte Zellen, d. h. primär differenzierte Zellen, die bevorzugt keinen embryonalen oder fötalen Phänotyp mehr besitzen, verwendet und besonders bevorzugt humane adulte Zellen. Beispiele hiervon sind adulte Progenitorzellen, gewebespezifische Zellen, vorzugsweise Osteoblasten, Fibroblasten, Hepatozyten und/oder glatte Muskelzellen.  
25

Es können aber auch veränderte Zellen, wie z. B. Tumorzellen, durch z. B. eine hochkonzentrierte, gleichzeitige oder sequenzielle Gabe von Wachstumsinhibitoren, wie Somatostatin, TGF beta und/oder Prostaglandine unterdrückt bzw. inhibiert werden. Hierbei können die bereits erwähnten Hydrogele oder Slow-release Materialien eingesetzt werden, die mindestens einen der genannten Wachstumsin-

hibitoren enthalten oder damit angereichert sind, und lokal oder in der Nachbarschaft der veränderten Zellen appliziert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich somit insbesondere zur lokal spezifischen und/oder gerichteten Vermehrung, strukturellem Wachstum und nachfolgender Differenzierung adulter Zellen und/oder zur Regeneration von Knochen, Geweben und/oder endokriner Organe, z.B. von Herzklappen, Venenklappen, Arterienklappen, Haut, Gefäßen, Aorten, Sehnen, Comea, Knorpel, Knochen, Tracea, Nerven, Miniskus, Diskus intervertebralis, Ureteren, Urethra oder Blasen.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur lokalen Applikation *in vivo* eingesetzt werden, in dem die genannten Wachstumsfaktoren entweder allein oder in Kombination als Mischung oder sequenziell eingesetzt werden oder in Kombination mit den genannten biologischen Matrices oder Trägerstrukturen, beispielsweise für die Geweberegeneration, wie z. B. die Leberregeneration, Herzmuskelregeneration oder für die Wundheilung im Bereich Haut, z.B. bei diabetischen Ulzera, oder Gingiva. Beispielsweise kann z. B. TPO in einem Hydrogel, z. B. Fibrin und/oder ein Polymere, wie z. B. Polylaktid oder Polyhydroxyalkanoat, und/oder ein Alginat, auf die Resektionsfläche z. B. einer Leber zur Leberregeneration aufgebracht werden oder bei z. B. akutem Leberversagen über einen Port mit Hilfe eines Katheters lokal oder systemisch appliziert werden.

20

Des weiteren kann eine biologische Matrix oder Trägerstruktur enthaltend mindestens einen der Wachstumsfaktoren TPO, EPO, GH, insbesondere HGH, Somatostatin, LIF und/oder CNTF als induktives Substrat für 3-D Wachstum und/oder Regeneration innerhalb einer Vermehrungsphase oder nach einer Vermehrungsphase zur Differenzierung oder zum Wachstumsarrest benutzt werden. Zum Beispiel kann mindestens einer der genannten Wachstumsfaktoren auf einen Stent in Kombination mit einem sogenannten Slow-release Material, wie oben beispielhaft beschrieben, aufgebracht werden.

30

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch eine biologische Matrix oder Trägerstruktur enthaltend mindestens einen der Wachstumsfaktoren Thrombopoietin (TPO), Erythropoietin (EPO) Wachstumsfaktor (GH), insbesondere "Human Growth Hormone" (HGH), Somatostatin, "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF) und/oder "Ciliary Neurotropic Factor" (CNTF), wobei die biologische Matrix oder Trägerstruktur hierbei auch zusätzlich mindestens einen der Wachstumsfaktoren TGF beta, Prostaglandin, GM-CSF, GHRH, TRH, GnRH, CRH, Dopamin, ADH, Oxytocin, Prolactin, Adrenocorticotropin, beta-Celltropin, Lutrotropin und/oder Vasopressin und gegebenenfalls zusätzlich einen oder mehrere Nervenregenerationsfaktoren, vorzugsweise "nerve growth factor" (NGF) und/oder einen oder mehrere Gefäßregenerationsfaktoren, vorzugsweise "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF) und/oder "Plateled Derived Growth Factor" (PDGF) enthalten kann.

10 Die erfindungsgemäße biologische Matrix oder Trägerstruktur stellt beispielsweise ein Implantat, ein Transplantat und/oder ein Trägermaterial zum Wachstum von Zellen dar, wobei die biologische Matrix oder Trägerstruktur ein Stent, ein Katheter, eine Haut, ein Hydrogel, ein Knochenersatzmaterial, ein allogenes, autologes oder xenogenes, azellularisiertes oder nicht-azellularisiertes Gewebe, ein synthetisches Gewebe, ein Feeder-Layer oder ein Fließ, wie z. B. ein Fließ aus Collagen, Laminin und/oder Fibronektin mit oder ohne synthetischer oder anderweitiger Grundstruktur, wie z. B. Kunststoff oder eine biologische Matrix, sein kann. Beispielhafte Ausführungsformen sind bereits oben beschrieben.

15 20 25 Die biologische Matrix oder Trägerstruktur ist, wie oben bereits näher beschrieben, vorzugsweise bereits mit gewebespezifischen Zellen, Vorläuferzellen, Knochenmarkszellen, peripheres Blut, Fettgewebe und/oder Fasergewebe vorbesiedelt oder für die *in vivo* Besiedelung bzw. das induktive Remodelling *in vitro* bereits vorbereitet.

Die biologische Matrix oder Trägerstruktur kann auch mit einer (Bio)polymerschicht, die mindestens einen der genannten Wachstumsfaktoren enthält, beschichtet sein. Als (Bio)polymerschicht eignen sich z. B. Fibrin, Plasma, Collagen und/oder Polylaktide.

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen biologischen Matrix oder Trägerstruktur, bei dem eine gegebenenfalls aktivierte biologische Matrix oder Trägerstruktur mit mindestens einem der Wachstumsfaktoren TPO, EPO, GH, insbesondere HGH, Somatostatin,

10

LIF und/oder CNTF beschichtet wird, wobei die genannte Matrix oder Trägerstruktur gegebenenfalls mit zusätzlich mindestens einem der Wachstumsfaktoren TGF beta, Prostaglandin, GM-CSF, GHRH, TRH, GnRH, CRH, Dopamin, ADH, Oxytocin, Prolactin, Adrenocorticotropin, beta-Celltropin, Lutrotropin und/oder Vasopressin und gegebenenfalls zusätzlich mit einem oder mehreren Nervenregenerationsfaktoren, vorzugsweise NGF und/oder einen oder mehreren Gefäßregenerationsfaktoren, vorzugsweise VEGF und/oder PDGF beschichtet werden kann.

15

Die Aktivierung der biologischen Matrix oder Trägerstruktur kann beispielsweise mittels Plasmaionisation, z.B. unter Verwendung von Wasserstoffperoxid, oder mittels Laseraktivierung erfolgen.

20

Alternativ kann eine Beschichtung mit einer biodegradablen (Bio)polymerschicht, die den oder die genannten Wachstumsfaktor(en) enthält, erfolgen. Hierzu eignen sich beispielsweise Fibrin, Plasma, Collagen und/oder Polylaktide.

25

Ebenso kann gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren die biologische Matrix oder Trägerstruktur in vitro mit Zellen, vorzugsweise gewebespezifischen Zellen, Vorläuferzellen, Knochenmarkszellen, peripheres Blut, Fettgewebe und/oder Fasergewebe, vorbesiedelt werden.

30

Die oben beschriebenen bevorzugten Merkmale bzw. Merkmalsbeispiele der vorliegenden Erfindung gelten in analoger Weise für das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren.

5 Die vorliegende Erfindung erstreckt sich auch auf eine Vorrichtung zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren, wobei ein perfundierter Bioreaktor insbesondere in Form eines geschlossenen Systems bevorzugt ist.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

10

**Beispiele:**

15 **1. Knochenregeneration**

Ein phasenreines beta Tricalciumphosphat wird mit einer Mikroporosität von z. B. > 15 µm als Granulat vorbereitet und in eine Form eines 3-D-Defektes entsprechend eines Patientenbedarfs geformt. Dies geschieht üblicherweise in einem Sinterungsprozess. Danach wird das Material mit Plasmaionisation behandelt, so dass eine Aktivierung der Oberflächen eintritt und das Konstrukt in eine Lösung mit Thrombopoietin, Erythropoietin und/oder Wachstumshormon (GH) eingelegt und damit in geringen Mengen definiert beschichtet wird. Alternativ kann eine Inkubation in einer Lösung ohne vorherige Oberflächenaktivierung oder eine Beschichtung mit einer biodegradablen (Bio)polymerschicht, die diese Wachstumsfaktoren enthält, erfolgen. Hier können z.B. Fibrin, Plasma, Collagen und/oder Polylaktide eingesetzt werden.

20

25

Dieses Konstrukt wird danach entweder sofort in einen Defekt eingebracht oder in vitro mit gewebespezifischen Zellen, Vorläuferzellen oder Knochenmarkszellen vorbesiedelt. Dadurch wird erreicht, dass der in vivo Wundheilungsprozess in

30

vitro vorweggenommen wird und damit nach Implantation in vivo (z.B. nach 7 Tagen) eine verkürzte Reintegrationszeit erfolgen kann. Eine Kombination mit Faktoren der Nervenregeneration (NGF) oder Gefäßregeneration (VEGF, PDGF) ist möglich. Hierbei ist die Kombination mit den strukturbildenden Faktoren und  
5 Milieukonzepten interessant.

In vivo und in vitro kommt es zur Integration des blutbildenden und stammzellreichen Knochenmarks wie auch zu einer beschleunigten Differenzierung von Osteoblasten und einer beschleunigten Resorption der Trägermatrix und einem Ersatz  
10 durch normalen Knochen. Durch die Rekrutierungskompetenz und den induktiven Charakter erfolgt eine ortspezifische Integration.

Diese kann weitergefördert werden, in dem bereits in vitro eine Übersiedlung an den externen Seiten mit Periost erfolgt.

15

## 2. Herzklappenregeneration und Herstellung urologischer Konstrukte

Eine biologische Matrix (allogene oder autologe Herzklappe mit und ohne Azellularisierung, eine synthetische Trägerstruktur aus Kunststoffen, die dem physiologischen Mikromilieu des kardiovaskulären Zielgewebes hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung der Kollagene und deren räumlicher Anordnung nahe kommt) wird mit Thrombopoietin und Erythropoietin als Wachstumsfaktoren vorbeschichtet.

25

Danach wird das Material mit Plasmaionisation behandelt (z. B. unter Verwendung von Wasserstoffperoxid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), wodurch zugleich eine Sterilisation erreicht wird, so dass eine Aktivierung der Oberflächen eintritt und das Konstrukt in eine Lösung mit Thrombopoietin, Erythropoietin und/oder Wachstumshormon (GH) eingelegt und damit in geringen Mengen definiert beschichtet wird. Alternativ  
30 kann eine Inkubation in einer Lösung ohne vorherige Oberflächenaktivierung oder eine Beschichtung mit einer biodegradablen (Bio)polymerschicht, die diese

Wachstumsfaktoren enthält, erfolgen. Hier können z.B. Fibrin, Plasma, Collagen oder Polylaktide eingesetzt werden.

Dieses Konstrukt wird danach entweder sofort an den Bedarfsort (Herzlappenposition, 5 als Patch oder Gefäßersatz) eingebracht oder in vitro mit gewebespezifischen Zellen, Vorläuferzellen oder Knochenmarkszellen vorbesiedelt. Dadurch wird erreicht, dass der in vivo Wundheilungsprozess in vitro vorweggenommen wird und damit nach Implantation in vivo (z.B. nach 7 Tagen) eine verkürzte Reintegrationszeit erfolgen kann. Eine Kombination mit Faktoren der Nervenregeneration (NGF) oder Gefäßregeneration (VEGF, PDGF) ist möglich, aber nicht 10 zwingend erforderlich.

In vivo und in vitro kommt es zur Integration des blutbildenden und stammzellreichen Knochenmarks wie auch der beschleunigten Differenzierung von Fibroblasten 15 und glatten Muskelzellen und einer beschleunigten Resorption der Trägermatrix und einen Ersatz durch normales kardiovaskuläres Gewebe. Durch die Rekrutierungskompetenz und den induktiven Charakter erfolgte eine ortspezifische Integration.

20 Diese kann weitergefördert werden, in dem bereits in vitro eine Übersiedlung an den externen Seiten mit Endothelzellen erfolgt.

In entsprechender Weise können urologische Konstrukte hergestellt werden.

25

**3. Vermehrung adulter Hepatozyten in Kokultur mit nichtparenchymalen Zellen**

Eine gemischte Leberzellpopulation aus einer Biopsie oder einem Teilektat werden 30 mit TPO und/oder EPO und/oder Wachstumshormon, z.B. HGH, in einer Konzentration von 10-50 ng/ml durch Zugabe zu dem Mediumüberstand behan-

delt. Die Aussaatzelldichte beträgt 10 000 Zellen/cm. Nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen mit 0,005% Collagenase und 0,01 % Trypsin unter Zusatz von 2 g/l Albumin oder autologem Serum (10-20%) für 5 h behandelt. Danach werden die Zellen abgesaugt und in Kulturmedium (Williams E (Williams et al.  
5 (1971) Exptl. Cell Res., 69, 106) mit 2 g/l Albumin dreifach gewaschen und danach zur Sedimentation in einer mit Collagen-beschichteten Petrischale gebracht.

Die Differenzierung der Zellen kann durch Überschichtung mit einer extrazellulären Matrix erreicht werden.

10

Alternativ können die Zellen wie üblich unter Bewegung an der Sedimentation gehindert werden und zur Aggregation zusammenkommen.

15

Um eine zu starke Vergrößerung der Aggregate während dem Wachstumsprozess zu vermeiden, können die Zellen in einer entsprechenden Vorrichtung über ein Gitter mit einer schneidenden Maschenstruktur von 500 µm Größe geführt werden, so dass immer wieder neue Tochteraggregate entstehen können. Dies kann in einem vollständig geschlossenen System geschehen. Idealerweise werden berührungslose Pumpsysteme (keine Quetschung durch peristaltische Systeme, sondern magnetisch oder durch Druckluftkompression von Schläuchen erzeugte, gerichtete Ströme oder Kolbenpumpen - automatisch oder manuell) eingesetzt.  
20

25

Danach können die Zellen eingekapselt und eingefroren werden. In der Kapselstruktur, können strukturierte Formen und Räume integriert werden, die eine in situ Wachstumsstruktur und Vergrößerung ermöglicht.

Alternativ kann auf die Kapsel verzichtet werden und durch die Präsenz der endothelialen Zellen in diesem System und gezielte Zugabe dieser Zellen eine Endothelialisierung und damit optimale Hämokompatibilität erreicht werden.

30

Durch den Scherstress in einem perfundierten Bioreaktor kommt es zu einer spontanen Konfluenz der Endothelzellen auf den Oberflächen der Aggregate. Bei Erreichen der Zielgröße können diese z.B. in den bereits idealerweise zur Kultur verwendeten Beuteln eingefroren werden.

5

#### 4. Weichteilgewebe (Muskelpatches, Nerven, Sehnen)

Für die Rekonstruktion von Bauchwanddefekten können Collagenfleece oder Fließe wie Laminin, Fibronektin mit oder ohne synthetische oder anderweitige Grundstruktur, wie z. B. Kunststoff oder eine biologische Matrix, oder räumlich definierte Strukturen (Röhren bei Nerven, Sehnen) entsprechend wie oben hergestellt werden. Diese Collagenfleece oder Strukturen werden geformt, mit TPO, EPO und/oder Wachstumshormon (GH) beschichtet und implantiert oder mit Zellen des Zielgewebes (z. B. Tendozyten, Neuronen) vorbesiedelt.

15

Eine biologische Matrix (allogene oder autologe Herzklappe mit und ohne Azellularisierung, eine synthetische Trägerstruktur aus Kunststoffen, die dem physiologischen Mikromilieu des Zielgewebes hinsichtlich chemischer Zusammensetzung der Kollagene und deren räumlicher Anordnung nahe kommt) wird mit Thrombopoietin und Erythropoietin als Wachstumsfaktoren vorbeschichtet.

25

Danach wird das Material mit Plasmaionisation behandelt (z. B. unter Verwendung von Wasserstoffperoxid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wodurch zugleich eine Sterilisation erreicht wird, so dass eine Aktivierung der Oberflächen eintritt und das Konstrukt in eine Lösung mit Thrombopoietin, Erythropoietin und/oder Wachstumshormon eingelegt und damit in geringen Mengen definiert beschichtet wird. Alternativ kann eine Inkubation in einer Lösung ohne vorherige Oberflächenaktivierung oder eine Beschichtung mit einer biodegradablen (Bio)polymerschicht, die diese Wachstumsfaktoren enthält, erfolgen. Hier kann z.B. Fibrin, Plasma, Collagen und/oder Polylaktide eingesetzt werden.

Dieses Konstrukt wird danach entweder sofort an den Bedarfsort (Bauchwand, Herzmuskel, Skelettmuskel als Patch) eingebracht oder in vitro mit gewebespezifischen Zellen, Vorläuferzellen oder Knochenmarkszellen vorbesiedelt. Dadurch wird erreicht, dass der in vivo Wundheilungsprozess in vitro vorweggenommen wird und damit nach Implantation in vivo (z.B. nach 7 Tagen) eine verkürzte Reintegrationszeit erfolgen kann. Eine Kombination mit Faktoren der Nervenregeneration (NGF) oder Gefäßregeneration (VEGF, PDGF) ist möglich, aber nicht zwingend erforderlich.

5

10 In vivo und in vitro kommt es zur Integration des blutbildenden und stammzellreichen Knochenmarks wie auch zu einer beschleunigten Differenzierung von Fibroblasten und glatten Muskelzellen und einer beschleunigten Resorption der Trägermatrix und einen Ersatz durch normales kardiovaskuläres Gewebe. Durch die Rekrutierungskompetenz und den induktiven Charakter erfolgte eine ortspezifische Integration.

15 Diese kann weitergefördert werden, in dem bereits in vitro eine Übersiedlung an den externen Seiten mit Keratinozyten (Bauchmuskel), Schwannschen Zellen und/oder Fasergewebe erfolgt.

20

25

30

Bionethos Holding GmbH

20.6.2002  
B38209

### **Patentansprüche**

- 5        1. Verfahren zur Vermehrung und Differenzierung von Zellen in vitro, dadurch gekennzeichnet, dass der Wachstumsprozess der Zellen durch den Einsatz der Wachstumsfaktoren Thrombopoietin (TPO) und/oder Erythropoietin (EPO), und/oder Wachstumshormon (GH), insbesondere "Human Growth Hormone" (HGH), und/oder Somatostatin und/oder "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF) und/oder "Ciliary Neurotropic Factor" (CNTF) eingeleitet bzw. terminiert und strukturell gelenkt wird.
  
- 10        2. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Wachstumsfaktor zusätzlich "Transforming Growth Factor beta" (TGF beta), Prostaglandine, Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor (GM-CSF), "Growth Hormone Releasing Hormone" (GHRH), "Thyrotropin-releasing Hormone" (TRH), "Gonadotropin-releasing Hormone" (GnRH), "Corticotropin-releasing Hormone" (CRH), Dopamin, "Antidiuretic Hormon" (ADH), Oxytocin, Prolactin, Adrenocorticotropin, beta-Celltropin, Lutrotropin und/oder Vasopressin eingesetzt wird.
  
- 15        3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich ein oder mehrere Nervenregenerationsfaktoren, vorzugsweise "nerve growth factor" (NGF) und/oder ein oder mehrere Gefäßregenerationsfaktoren, vorzugsweise "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF) und/oder "Plateled Derived Growth Factor" (PDGF), eingesetzt werden.
  
- 20
  
- 25

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren in Anwesenheit von Endothelzellen durchgeführt wird.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Wachstumsprozess der Zellen lokal eingeleitet bzw. terminiert und strukturell gelenkt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Wachstumsprozess der Zellen durch eine biologische Matrix oder durch eine Trägerstruktur lokal eingeleitet bzw. terminiert und strukturell gelenkt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Matrix oder Trägerstruktur mit einem der genannten Wachstumsfaktoren oder mit einer Kombination der genannten Wachstumsfaktoren als Mischung oder sequenziell behandelt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass als biologische Matrix oder als Trägerstruktur ein Implantat, ein Transplantat und/oder ein Trägermaterial zum Wachstum von Zellen verwendet wird.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Matrix oder Trägerstruktur mit Zellen, vorzugsweise gewebespezifischen Zellen, Vorläuferzellen, Knochenmarkszellen, peripheres Blut, Fettgewebe und/oder Fasergewebe, vorbesiedelt oder für die *in vivo* Besiedelung bzw. das induktive Remodelling *in vitro* bereits vorbereitet wurde.
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet dass als Zellen adulte Progenitorzellen und/oder

gewebespezifische Zellen, vorzugsweise Osteoblasten, Fibroblasten, Hepatozyten und/oder glatte Muskelzellen eingesetzt werden.

11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1-10 zur lokal spezifischen und/oder gerichteten Vermehrung, strukturellem Wachstum und nachfolgender Differenzierung adulter Zellen und/oder zur Regeneration von Knochen, Geweben und/oder endokriner Organe.  
5
12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass mittels einer geeigneten Vorrichtung die sich gegebenenfalls während des Wachstumsprozesses bildenden Zellaggregate zerkleinert und gegebenenfalls eingekapselt und gegebenenfalls eingefroren werden.  
10
13. Biologische Matrix oder Trägerstruktur enthaltend mindestens einen der Wachstumsfaktoren TPO, EPO, GH, insbesondere HGH, Somatostatin, LIF und/oder CNTF.  
15
14. Biologische Matrix oder Trägerstruktur nach Anspruch 13 enthaltend zusätzlich mindestens einen der Wachstumsfaktoren TGF beta, Prostaglandine, GM-CSF, GHRH, TRH, GnRH, CRH, Dopamin, ADH, Oxytocin, Prolactin, Adrenocorticotropin, beta-Celltropin, Lutrotropin und/oder Vasopressin und gegebenenfalls zusätzlich einen oder mehrere Nervenregenerationsfaktoren, vorzugsweise NGF und/oder einen oder mehrere Gefäßregenerationsfaktoren, vorzugsweise VEGF und/oder PDGF.  
20
15. Biologische Matrix oder Trägerstruktur nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Matrix oder Trägerstruktur ein Implantat, ein Transplantat und/oder ein Trägermaterial zum Wachstum von Zellen ist.  
25

16. Biologische Matrix oder Trägerstruktur nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Matrix oder Trägerstruktur ein Stent, ein Patch, ein Katheter, eine Haut, ein Hydrogel, ein Knochenersatzmaterial, ein allogenes, autologes oder xenogenes, azellularisiertes oder nicht-azellularisiertes Gewebe, ein synthetisches Gewebe, ein Feeder-Layer oder ein Fließ ist.  
5
17. Biologische Matrix oder Trägerstruktur nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Matrix oder Trägerstruktur mit Zellen, vorzugsweise gewebespezifischen Zellen, Vorläuferzellen, Knochenmarkszellen, peripheres Blut, Fettgewebe und/oder Fasergewebe, vorbesiedelt ist.  
10
18. Biologische Matrix oder Trägerstruktur nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Matrix oder Trägerstruktur mit einer biodegradablen (Bio)polymerschicht enthaltend mindestens einen der genannten Wachstumsfaktoren beschichtet ist.  
15
19. Verfahren zur Herstellung einer biologischen Matrix oder Trägerstruktur nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass eine gegebenenfalls aktivierte biologische Matrix oder Trägerstruktur mit mindestens einem der Wachstumsfaktoren TPO, EPO, GH, insbesondere HGH, Somatostatin, LIF und/oder CNTF beschichtet wird.  
20
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte Matrix oder Trägerstruktur mit zusätzlich mindestens einem der Wachstumsfaktoren TGF beta, Prostaglandin, GM-CSF, GHRH, TRH, GnRH, CRH, Dopamin, ADH, Oxytocin, Prolactin, Adrenocorticotropin, beta-Celltropin, Lutrotropin und/oder Vasopressin und gegebenenfalls zusätzlich mit einem oder mehreren Nervenregenerationsfaktoren,  
25  
30

vorzugsweise NGF und/oder einen oder mehreren Gefäßregenerationsfaktoren, vorzugsweise VEGF und/oder PDGF beschichtet wird.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass die  
5 Aktivierung der biologischen Matrix oder Trägerstruktur mittels  
Plasmaionisation oder Laseraktivierung erfolgt.
22. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 21, dadurch  
10 gekennzeichnet, dass die genannte biologische Matrix oder Trägerstruktur in  
vitro mit Zellen, vorzugsweise gewebespezifischen Zellen, Vorläuferzellen,  
Knochenmarkszellen, peripheres Blut, Fettgewebe und/oder Fasergewebe,  
vorbesiedelt wird.
23. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens gemäß mindestens einem der  
15 Ansprüche 1 bis 12 und 19 bis 22.
24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die  
Vorrichtung ein perfundierter Bioreaktor, vorzugsweise in Form eines  
geschlossenen Systems ist.

### **Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft zum einen ein Verfahren zur Vermehrung und Differenzierung von Zellen in vitro, dadurch gekennzeichnet, dass der Wachstumsprozess der Zellen durch den Einsatz der Wachstumsfaktoren Thrombopoietin (TPO) und/oder Erythropoietin (EPO), und/oder Wachstumshormon (GH), insbesondere "Human Growth Hormone" (HGH), und/oder Somatostatin und/oder "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF) und/oder "Ciliary Neurotropic Factor" (CNTF) eingeleitet bzw. terminiert und strukturell gelenkt wird, und zum anderen eine biologische Matrix oder Trägerstruktur enthaltend die genannten Wachstumsfaktoren sowie ein Verfahren und eine Vorrichtung zu deren Herstellung bzw. zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.  
As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**